

大豆短肽颗粒剂抗疲劳和抗氧化的功效学研究

乌日根¹, 赵国君², 张海龙³, 宋宏春³

(1. 内蒙古医科大学附属医院, 内蒙古 呼和浩特 010050; 2. 包头市第四医院; 3. 内蒙古医科大学)

摘要: 目的: 通过功效实验来观察大豆短肽颗粒剂的保健功效作用。方法: 通过小鼠的抗疲劳实验和抗氧化实验对大豆短肽颗粒剂的功效及作用进行了研究。结果: 大豆短肽颗粒剂有明显的抗疲劳和抗氧化作用。结论: 采用该方法确定大豆短肽颗粒剂的功效与作用, 操作简便、准确可靠, 为大豆短肽颗粒剂的临床试验提供科学的理论依据。

关键词: 大豆短肽颗粒剂; 抗疲劳; 抗氧化

中图分类号: R969.4

文献标识码: A

文章编号: 2095-512X(2015)05-0438-04

DOI:10.16343/j.cnki.issn.2095-512x.2015.05.009

STUDY ON EFFECT OF SOYBEAN PEPTIDE GRANULES ON ANTI FATIGUE AND ANTI OXIDANT

WU Ri-gen, ZHANG Hai-long, SONG Hong-chun

(Affiliated Hospital Inner Mongolia Medical University Hohhot 010050 China)

Abstract: **Objective:** To observe the effect of health care effect of soybean short peptide granules by the efficacy experiment. **Methods:** The effect and the role of anti fatigue and antioxidant experiments in mice on soybean peptide granules were studied. **Results:** Soybean short peptide granule had obvious anti fatigue and anti oxidation. **Conclusion:** Using this method to determine the function and effect of soybean peptide granules, simple operation, accurate and reliable, and to provide a scientific basis for clinical trials of soybean peptide granules.

Key words: soybean short peptide granules; anti fatigue; antioxidant

大豆短肽原剂型为粉剂, 具有增强体能和消除疲劳的功效, 同时易于消化和吸收^[1], 但原剂型服用十分不便。随着人们生活水平的不断提高, 对保健类产品的质量要求也越来越高^[2]。所以拟改为颗粒剂, 以便于病人服用、携带和规模化生产。同时通过功效实验来观察大豆短肽颗粒剂的保健功效作用^[3]。文献资料报道大豆短肽具有抗疲劳、降血压^[4-5]、抗氧化^[6]及降胆固醇^[7]、促进脂肪代谢^[8]等多种生理活性。所以我们通过小鼠的抗疲

劳实验和抗氧化实验对大豆短肽颗粒剂的功效及作用进行了研究, 为大豆短肽的保健功能提供了科学的理论依据。

1 实验药品与设备

1.1 实验动物与药品

Wistar 大鼠、昆明种小白鼠(内蒙古大学实验动物中心) 大豆短肽颗粒剂(内蒙古医科大学药学院自制 批号 20120306) 乳清蛋白粉(索莱宝生物

收稿日期: 2015-05-09; 修回日期: 2015-07-02

作者简介: 乌日根(1972-) 男, 内蒙古医科大学附属医院药剂部副主任药师。

通讯作者: 宋宏春 教授, 硕士研究生导师 E-mail: Songhongchun1119@sina.com 内蒙古医科大学 010050

科技有限公司) 人脐静脉内皮细胞(ECV340) (中国典型培养物保藏中心) 试剂青霉素 - 链霉素双抗(美国 hyclone 公司) 胎牛血清(天津灏洋生物公司) 胰蛋白酶(Amresco0458) 甲基偶氮唑盐(MTT , 美国 Sigma 公司) DMSO 液(北京化工厂) , 双氧水 H_2O_2 (分析纯 , 天津市科盟化工工贸有限公司) 。

1.2 实验设备

HC - TP11B. 10 架盘药物天平(北京宣武天平厂制) 酶标仪(北京市永光医疗仪器厂) , AB135 - s 电子天平和 AI204 电子天平(梅特勒 - 托利多仪器有限公司) , KQ - 250DA 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司) 。超净工作台(北京市永光医疗仪器厂) 。

2 实验方法

2.1 抗疲劳实验

2.1.1 实验动物分组及给药剂量 取小鼠 70 只 , 适应性游泳 2d , 每天 10min , 淘汰不会游泳的小鼠 , 将剩余 50 只小鼠随机分为 5 组 , 每组 10 只 , 雌雄各半 , 体重 18 ~ 22g 。阴性对照组(CG) 蒸馏水灌胃 ; 大豆短肽颗粒剂低剂量组、大豆短肽颗粒剂中剂量组和大豆短肽颗粒剂高剂量组 , 其给药剂量分别为 2.0 g/kg (LD) 、4.0 g/kg (MD) 和 8.0 g/kg (HD) 。阳性对照组(WPC) 乳清蛋白溶液灌胃 , 剂量为 4.0 g/kg 。小鼠每天进行 45min 游泳练习 , 游泳后灌胃 , 连续实验 30d 。

2.1.2 测定指标 力竭游泳时间测定^[9] 于第 31 日取前一日进行血乳酸测量的各组 10 只小鼠 , 用肥皂水洗去小鼠体表油脂 , 然后将小鼠尾根部负荷 5% 体重的铅皮 , 放入水温 (25 ± 1.0) °C 、水深 30cm 的水槽中游泳 , 记录小鼠自入水后到沉入水中 7s 不能浮出水面(处于力竭状态) 的时间。

2.2 抗氧化实验^[14~16]

2.2.1 含药血清的制备 大鼠灌胃给予大豆短肽颗粒剂 4.0 g/kg , 连续 5d 2 次/d , 腹主动脉采血 , 静置 30min 于 4°C 3000r/min 离心 15min , 分离血清 , 56°C 灭活 30min , 微孔滤膜过滤除菌。收集血清 , 备用。

2.2.2 人脐静脉细胞(ECV340) 培养 ECV340 常规方法培养 : 以含 10% 胎牛血清 , 1% 的双抗的 1640 培养液培养 ECV340 细胞 , 置于 37°C 5% CO_2 条件培养 , 定期换液 , 待细胞进入对数生长期 , 用

0.25% 胰蛋白酶消化传代。

2.2.3 96 孔板的接种 取生长良好的对数生长期细胞 , 用 0.25% 的胰酶消化 , 制成细胞悬液 , 以 5×10^4 /mL 的密度接种于 96 孔板上(每孔 100 μ L) , 培养 24h 后 , 换为含 5% 胎牛血清 1640 培养液培养 24h 后细胞生长至 50% ~ 60% 用于实验。

2.2.4 筛选过氧化氢氧化损伤的最适浓度 以终浓度为 100、200、400、600 μ mol/L 过氧化氢干预接种于 96 孔板的 ECV340 细胞 , 每组 8 孔 , 干预 12h 后 , 吸弃培养液 , 加无血清培养液 90 μ L、10 μ L H_2O_2 , MTT 法检测细胞活力 , 即每孔加 5g/L 的 MTT 液 10 μ L , 培养 4h 后吸弃 75 μ L 培养液 , 再加 75 μ L 二甲基亚砷(DMSO) 并震荡。用酶标仪(波长为 490nm 及 570nm) 检测吸光度 A 值。得出最佳 H_2O_2 浓度为 200 μ mol/L。

2.2.5 MTT 法检测含药血清对细胞氧化损伤的影响^[17,18] 选取 8 只 wistar 大鼠 , 随机分为 2 组 , 即阳性对照组(灌胃给予丹参滴丸溶液 , 剂量为 4.0 g/kg 连续 5d 2 次/d) , 原药组给予大豆短肽颗粒剂 4.0 g/kg 连续 5d 2 次/d、制备含药血清(处理方法同上) 。取细胞培养板 , 每孔加入经微孔滤膜灭菌的 1640 培养液 100 μ L , 每组设 8 复孔 , 分为以下几组 : (1) 含原药血清组 , (2) 阳性组 (3) 模型组 , (4) 阴性对照组。 (1) (2) 两组每孔加血清 20 μ L , 预处理 8h , (1) ~ (3) 组加终浓度为 200 μ mol/L 的 H_2O_2 和终浓度同前的含药血清(血清占总体积的 1/5) 继续培养 12h 后 , 然后加入 10 μ L 浓度为 5g/L 的 MTT , 培养 4h , 再加入 75 μ L 的 DMSO , 用酶标仪测定 96 孔板在 570nm 及 490nm 处的吸收值 , 记录数据 , 进行统计学处理。

3 实验结果

3.1 抗疲劳实验结果

小鼠服用大豆短肽颗粒剂后 , 长时间运动耗能后 , 小鼠的体重没有因此下降。高剂量组和阳性对照组力竭游泳时间与阴性对照组比较有显著性差异 ($P < 0.05$) , 其力竭游泳时间分别延长了 66.5% 和 69.2% ; 中剂量组与阴性对照组比较有极显著性差异 ($P < 0.01$) 力竭游泳时间延长了 87.5% ; 中剂量组与阳性对照组比较有极显著性差异 ($P < 0.01$) 。在宏观上体现出大豆短肽颗粒剂具有良好的抗疲劳作用^[10,11~13] 。见表 1、表 2。

表1 小鼠实验前后体重($n=10 \bar{x} \pm s$)Tab. 1 The weight of mice before and after the experiment ($n=10 \bar{x} \pm s$)

组别	空白	LD	MD	HD	乳清
体重/g	24.8 ± 2.4	25.9 ± 2.9	24.7 ± 2.9	24.8 ± 2.8	24.8 ± 2.4
	29.0 ± 2.2	31.9 ± 1.7	30.4 ± 0.7	32.9 ± 2.1	30.9 ± 1.3

表2 大豆短肽颗粒剂对耐力运动小鼠负重游泳时间的影响($\min \bar{x} \pm s$)Tab. 2 Effects of soybean peptide granules on swimming time load endurance in mice($\min \bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	(min)
阴性对照组	等容量生理盐水	34.4 ± 7.38
低剂量组	2.0	35.9 ± 6.54
中剂量组	4.0	64.5 ± 6.72**
高剂量组	8.0	57.3 ± 5.79*
阳性对照	4.0	58.2 ± 5.29

与阴性对照组和阳性对照组比较* $P < 0.05$ 有显著性差异, 与阴性对照组和阳性对照组比较** $P < 0.01$ 有极显著性差异

3.2 抗氧化实验^[19] 结果

(1) 模型组细胞活力显著低于阴性对照组(* $P < 0.05$) 表明过氧化氢氧化损伤模型成功建立; (2) 含药血清组细胞活力显著高于模型组(* $P < 0.05$) 表明大豆短肽原药具有良好的抗氧化作用; (3) 含药血清组细胞活力高于阳性对照组(* $P < 0.05$) 表明大豆短肽原药的抗氧化活性优于丹参滴丸。见表4。

表3 大豆短肽抗氧化作用的影响($\bar{x} \pm s$)Tab. 3 The effects of antioxidant effects of soybean peptides ($\bar{x} \pm s$)

组别	培养板孔数	$\bar{x} \pm s$
模型组	8	0.126 ± 0.020**
含药血清组	8	0.482 ± 0.178*
阴性对照组	8	0.228 ± 0.035
阳性对照组	8	0.124 ± 0.035

与模型组和阳性对照组比较* $P < 0.05$; 和阴性对照组比较** $P < 0.05$

4 讨论

疲劳是机体活动到达一定程度后产生的一种自我保护的生理机制, 可以防止威胁生命过度机能衰竭。小鼠服用大豆短肽颗粒剂后, 长时间运动耗能后, 小鼠的体重没有因此下降。负重游泳实验证实, 高剂量组和阳性对照组力竭游泳时间与阴性对照组比较有显著性差异($P < 0.05$) 其力竭游泳时间分别延长了66.5%和69.2%; 中剂量组与阴性对照组比较有极显著性差异($P < 0.01$) 力竭游泳时

间延长了87.5%; 中剂量组与阳性对照组比较有极显著性差异($P < 0.01$)。在宏观上体现出大豆短肽具有良好的抗疲劳作用。

通过运用血清药理学方法探讨大豆短肽颗粒剂含药血清对过氧化氢诱导的人脐静脉细胞氧化损伤的影响, 得出大豆短肽颗粒剂发挥抗氧化作用的有效剂量应适中, 从而为大豆短肽的临床服用剂量提供了参考。

参考文献

- [1] 李振华, 赵文海. 鹿茸多肽对抗骨关节炎软骨细胞氧化损伤作用的实验研究[J]. 中国骨伤, 2011; 24(3): 245-247
- [2] 钟晓, 张彩霞. 大豆食品摄入与乳腺癌发病关系的 meta 分析[J]. 卫生研究, 2012; 41(4): 670-672
- [3] 倪倩, 何东平. 大豆多肽的制备及其应用研究[J]. 粮食与食品工业, 2008; 15(2): 15-19
- [4] Dziuba J, Minkiewicz P, Nalecz D, et al. Database of biologically active peptide sequences[J]. *Nahrung*, 1999; 43(3): 190-195
- [5] 王丽娟. 大豆肽的制备及其体内抗氧化活性[D]: 硕士学位论文. 江南大学, 2008: 35
- [6] Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean β -conglycinin[J]. *J Agric Food Chem*, 1995; 43(3): 574-578
- [7] Yasuyuki T, Yoshikawa M. Introduction of enterostatin (vp-dpr) and a related sequence into soybean proglycinin alablb subunit by site directed mutagenesis[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000; 64(12): 2731-2733
- [8] 马立丽. 血清总胆固醇水平对大豆蛋白降血脂作用的影响[J]. 中国预防医学杂志, 2014; 15(6): 597-600
- [9] Lecarpentier. Physiological role of free radicals in skeletal muscles[J]. *J Appl Physiol*, 2007; 103(6): 1917-1918
- [10] Takenaka A, Annaka H, Kimura Y, et al. Reduction of paraquat-induced oxidative stress in rats by dietary soy peptide[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003; 67(2): 278-283

(下转第444页)

因参与的过程,引起细胞发生转化,需与多种抑癌基因的改变协同作用。检测单一指标来预测肿瘤的灵敏性与特异性均不尽人意,细胞周期素 D1 及 RasP21 蛋白均是与胃癌发生发展及转移具有密切关系的指标,因此,联合检测有助于预测胃癌的发生、发展及预后。

参考文献

- [1]左连富. 流式细胞术与生物医学[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1996: 265
- [2]Morkve O, Laerum OD. Flow cytometry measurement of P53 protein expression and DNA content in paraffin embedded tissue from bronchial carcinoma[J]. *Cytometry*, 1991; **12**(5): 438
- [3]陈兵, 刘为纹, 府伟灵, 等. 胃癌组织中端粒酶活性与细胞周期蛋白 D1 表达关系的研究[J]. *肿瘤防治研究*, 2011; **30**(6): 449 - 451
- [4]Huang GX, Cheng RX, Feng DY. P16 and cyclinD₁ protein expression and P16 gene mutation in primary human hepatocellular carcinoma[J]. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2010; **26**(6): 527 - 530
- [5]Wang X, Zou S. The relationship of cyclinD₁ and estrogen receptorexpression in the process of proliferation andmetastasis in breast neoplasm[J]. *Tongji Med Univ*, 2008; **21**(3): 231 - 232
- [6]Guggerm K, appeler A, Von lanthen S, et al. Alterations of cellcycle regulators are less frequent in advanced non - small cell lung cancer than in resectable tumours[J]. *Lung Cancer* 2001; **33**(2/3): 229 - 239
- [7]Zhang L, Xu Y, Ge Y, et al. Expression of P27 protein and CyclinD₁ in laryngeal carcinoma [J]. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 2002; **16**(12): 646 - 652
- [8]程剑, 苏长青. CyclinD₁ 在胃癌中的表达扩增及其生物学意义[J]. *临床消化病杂志* 2001; **13**(4): 171 - 172
- [9]Bartkovaj, Lukasj, Mullerh, et al. Abnormal patterns of D - type cyclin expression and G1 regulation in human head and neck cancer[J]. *Cancer Res* 2010; **55**(4): 949
- [10]Nakamurum, Konish N, Hiassy, et al. Frequent alterations of cell - cycle regulation in astrocytic tumors as detected by molecular genetic and immunohistochemical analyses [J]. *Brain Tumor Pathol* 2009; **15**(2): 83
- [11]孙哲, 高鹤立. P21, Ras, P16 在大肠癌中的表达及临床意义[J]. *世界华人消化杂志* 2011; **9**(12): 1399
- [12]程坤. 膀胱肿瘤组织中 Rb、E2F - 1 及 P21 的表达及其意义[J]. *现代肿瘤医学* 2010; (8):
- [13]Kim YJ, Chu HD, Kim DY, et al. Expression of cellular oncogene in human gastric carcinoma: c - myc, Cerbb - 2 and c - Ha - ras [J]. *J Surg Oncol* 1993; **54**(3): 167 - 170
- [14]魏茂富, 卢义生, 刘镜文, 等. P21 在大肠癌、大肠腺瘤及正常大肠粘膜中的表达及临床意义[J]. *中国现代医生* 2009; **47**(4): 1 - 14
- [15]宋懿懿, 顾爱琴, 韩宝惠. P21、P53 和 c - erb b - 2 在非小细胞肺癌组织中的表达及临床意义[J]. *上海交通大学学报(医学版)* 2011; **31**(3): 295 - 298

(责任编辑: 程立新)

(上接第 440 页)

- [11]Stainsby WN. Biochemical and physiological bases for lactate production [J]. *Med. Sci. Sports Exerc*, 1986; **18**(3): 341
- [12]郭冰冰. 不同运动负荷大鼠骨骼肌损伤及修复过程中血液肌酸激酶和乳酸脱氢酶变化的研究[D]. 吉林大学, 2012; 6: 60
- [13]彭莉, 王启荣, 毕秋芸. 补充大豆多肽对递增负荷运动大鼠血清 Ldh、alt、ast 活性的影响[J]. *北京体育大学学报* 2008; **31**(2): 199
- [14]G van hall. The effect of free glutamine and peptide ingestion on the rate of muscle glycogen resynthesis in man [J]. *Int J Sport Med* 2000; **21**: 25
- [15]周越, 李扬, 王瑞元, 等. 运动性骨骼肌损伤评价指标 - 血清 CK、Ldh、Mb 的比较[J]. *中国运动医学杂志*, 2008; **27**(2): 206 - 208
- [16]Paddon - Jones D, Keech A, Lonergan A, et al. Differential expression of muscle damage in humans following acute fast and slow velocity eccentric exercise [J]. *J Sci Med Sport* 2005; **8**(3): 255 - 63
- [17]郭刚. 骨骼肌运动性微损伤机制及牛磺酸、白藜芦醇干预效果研究[D]. [博士学位论文]. 上海: 上海体育学院, 2009
- [18]孙茹. 骨骼肌损伤与修复过程中炎症反应与肌卫星细胞再生关系的研究[D]. [博士学位论文]. 长春: 东北师范大学, 2009
- [19]Gros J, Manceau M, Thomev, et al. A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells [J]. *Nature* 2005; **435**(7044): 954 - 958

(责任编辑: 于晶峰)